

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09241233 A**(43) Date of publication of application: **16 . 09 . 97**

(51) Int. Cl

C07C309/86
C07F 5/00
C09K 11/06
G01N 33/533

(21) Application number: **08051185**(22) Date of filing: **08 . 03 . 96**(71) Applicant: **MATSUMOTO KAZUKO SUZUKI
MOTOR CORP**(72) Inventor: **MATSUMOTO KAZUKO
EN HIROTOSHI**

(54) **LABELING REAGENT FOR IMMUNOLOGICAL
MEASUREMENT AND FLUORESCENT
COMPOUND AND COMPLEX USING THE SAME,
AND IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT OF
BIOLOGICAL SUBSTANCE WITH THE SAME**

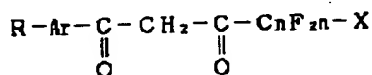
target, a protein such as an antigen or antibody, and
can emit fluorescent light in a state of the reagent
alone and also in a state bound to the protein.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

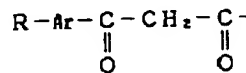
(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a fluorescent compound large in fluorescent intensity, capable of being synthesized in a high yield and at a low cost, and useful as a labeling reagent for immunological measurements, capable of being used for both solid phase measurements and liquid phase measurements in immunological measurement methods and rapidly giving measurement results in a few measuring processes.

SOLUTION: This complex comprises a compound of formula I [R is a group capable of being bound to proteins; Ar is a group having conjugated double bonds; X is F, a group of formula II; (n) is an integer] and a lanthanide metal ion. The compound of formula I is obtained by subjecting an acetylated aromatic ring compound and an ethyl perfluorocarboxylate compound or a diethyl perfluorodicarboxylate compound to a Claisen's condensation reaction and subsequently subjecting the obtained β -diketone compound and chlorosulfuric acid to a chlorosulfonation reaction. The labeling reagent can directly be bound to a measurement



I



II

(43)公開日 平成9年(1997)9月16日

(51)Int.Cl. ^a	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 C 309/86		7419-4H	C 0 7 C 309/86	
C 0 7 F 5/00			C 0 7 F 5/00	D
C 0 9 K 11/06			C 0 9 K 11/06	Z
G 0 1 N 33/533			G 0 1 N 33/533	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O.L (全 20 頁)

(21)出願番号	特願平8-51185	(71)出願人	592222352 松本 和子 神奈川県川崎市多摩区登戸2578-1-708
(22)出願日	平成8年(1996)3月8日	(71)出願人	000002082 スズキ株式会社 静岡県浜松市高塚町300番地
特許法第30条第1項適用申請有り	1995年11月17日 開催の「日本分析化学会関東支部創立40周年記念会」において文書をもって発表	(72)発明者	松本 和子 神奈川県川崎市多摩区登戸2578-1-708
		(72)発明者	袁 景利 東京都板橋区大山東町24-17 共栄荘206号
		(74)代理人	弁理士 奥山 尚男 (外4名)

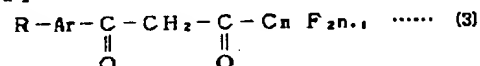
(54) 【発明の名称】 免疫測定用標識試薬及びそれに用いる蛍光性化合物及び錯体、及びそれらを用いる生物物質の免疫測定法

(57) 【要約】

【課題】 蛍光発光強度が強く、合成収率が良く、免疫測定法において固相測定と液相測定の両方が可能であり、測定手順も少ない標識試薬及びそれに用いる蛍光性化合物及び錯体を提供する。

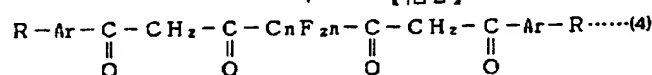
【解決手段】 一般式 (3)

* 【化1】



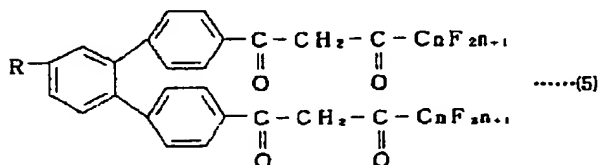
及び一般式 (4)

【化2】



及び一般式 (5)

【化3】

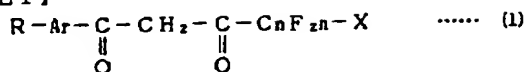


(一般式(3)～(5)中、Rはタンパク質に結合可能な基であり、A_rは共役二重結合系であり、nは整数である。)で表される蛍光性化合物、及び該蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯体、及び該蛍光性化合物または該錯体部分を有する免疫測定用標識試薬。

【特許請求の範囲】

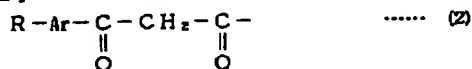
【請求項 1】 一般式 (1)

【化 1】



(式中、Rはタンパク質に結合可能な基であり、Arは共役二重結合系であり、Xはフッ素原子または一般式 (2))

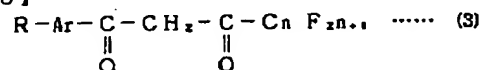
【化 2】



*で表される基であり、nは整数である。) で表される蛍光性化合物。

【請求項 2】 上記一般式 (1) が一般式 (3)

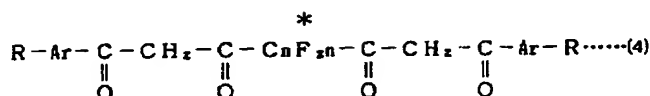
【化 3】



で表される請求項 1 に記載の蛍光性化合物。

【請求項 3】 上記一般式 (1) が一般式 (4)

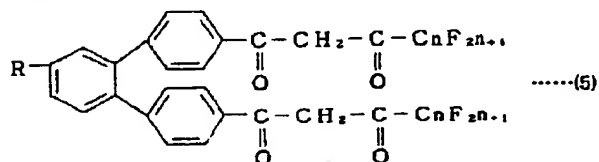
【化 4】



で表される請求項 1 に記載の蛍光性化合物。

【請求項 4】 上記一般式 (1) が一般式 (5)

【化 5】



で表される請求項 1 に記載の蛍光性化合物。

【請求項 5】 請求項 1～請求項 4 のいずれかに記載の蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯体。

【請求項 6】 請求項 1～請求項 4 のいずれかに記載の蛍光性化合物または請求項 5 に記載の錯体部分を有する免疫測定用標識試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床検査分野において用いられる時間分解蛍光免疫測定法等の標識試薬、及びそれに用いる蛍光性化合物及びその錯体に関する。なお、本明細書中において、「蛍光性化合物」とは、金属イオンに配位して錯体となったときに、錯体由来の蛍光を発することのできる化合物をいう。

【0002】

【従来の技術】従来の測定用試薬としては、LKBシステムで用いられるβ-ジケトン型標識試薬、芳香アミン型標識試薬(BCPDA系標識試薬)がある。LKBシステムとは、標識試薬(Euキレート標識抗体)を単体として用いても、標識試薬と抗原等のタンパク質が結合した状態で用いても、蛍光を発光することができないため、抗原の濃度を測定するために、増強剤として2-ナフトイルトリフルオロアセトンとトリ-*n*-オクチルホスフィンオキサイドとトリトンX-100溶液を加えて、水溶液中にEu(III)を遊離させた後、Eu(III)

キレートミセルの状態にして蛍光を測定するものである。

【0003】しかし、これには次のような問題点がある。第一に、環境(血清、試薬、空気中等)からの汚染を受けやすいという欠点がある。すなわち、水溶液中に遊離したEu(III)と十分に反応させるために、過剰の増強剤を加える必要があり、この過剰の増強剤が環境(空気、血清等)中のユウロピウムと反応し、抗原の濃度が実際より高く測定されてしまう。第二に、抗原、抗体等のタンパク質と蛍光性化合物が結合した状態では、蛍光を発することができないため、測定操作手順中に増強試薬を加える操作が必要であること、および、水溶液中でないと蛍光発光の可能な物質とならず、固相測定ができないという欠点がある。

【0004】上記芳香アミン型標識試薬(BCPDA系標識試薬)に用いる蛍光性化合物としては、4,7-ビス(クロロスルフォフェニル)-1,10-フェナントロリン-2,9-ジカルボン酸(BCPDA)、ビスクロロスルフォフェニルフェナントロリンジカルボン酸等が挙げられる。しかし、芳香アミン型標識試薬を用いた場合、上記β-ジケトン型標識試薬を用いたLKBシステムと比較して、蛍光強度が1/100～1/200と弱い。蛍光強度が弱いと、測定対象の高感度な定量ができない。すなわち、検出限界が高く、低濃度域までの測定ができない。蛍光強度を高めるために、特開平2-88968号公報には多重標識型に改良した標識試薬が開示されているが、十分な蛍光強度を得るには至っていない。

【0005】さらに、近年開発されたβ-ジケトン型標識試薬が、特開平4-244085号公報及び特開平7-10819号公報に記載されている。しかし、これらの標識試薬についても、上記BCPDAを用いた芳香アミン型標識試薬と比較して、蛍光強度が1.4倍程と弱い。また、合成における工程数が多く、目標とする化合

物の収率も良くない。

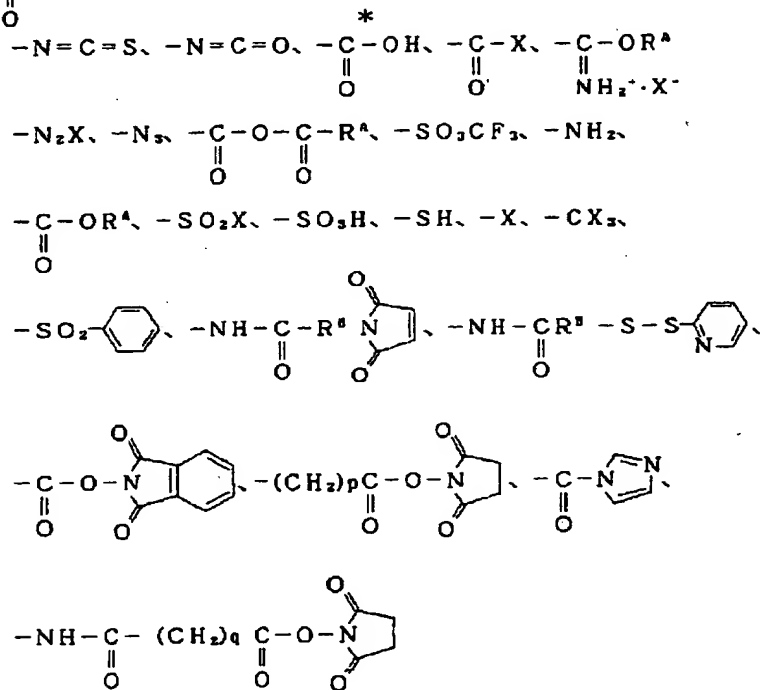
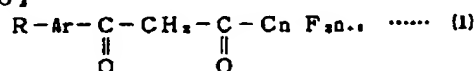
【0006】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、(1) 蛍光強度が強く、(2) 芳香アミン型標識試薬 (BCPDA系標識試薬) と比較して安価であり、(3) 合成収率が高く、(4) 固相測定と液相測定 の両方が可能であり、(5) 測定手順が少なく、迅速に結果を得ることができ、(6) 合成した標識試薬が安定な物質であり、長期保存が可能である標識試薬と、それに用いる蛍光性化合物及びその錯体を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を解決するために、本発明は、一般式 (1)

【化6】



(ただし、Xはハライド原子、 $-OSO_2CH_3$ 、 $-OSO_2R$ 、 $-OSO_2CF_3$ 、 $-SO_2C_6H_5$ 、 $-OSO_2-C_6H_4-CH_3$ から選択され、 R^A はアルキル基、アルケニル基、アリール基、アラルキル基から選択され、 R^B はアルキレン基、アリーレン基、アラルキレン基から選択され、pは0~5、qは2~10である。)

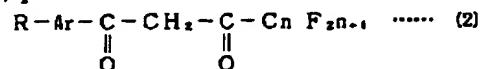
この中で特に塩化スルホニル基 ($-SO_2Cl$) が、タンパク質等のアミノ基と反応性に富み、比較的簡単な方法で蛍光性化合物に導入できるため、好ましい。

【0009】上記一般式 (1) 中のRと結合するタンパク質としては、具体的には抗体類、ビオチン標識抗体類、抗原類、アビジン、ストレプトアビジン、ウシ血清

* (式中、Rはタンパク質に結合可能な基であり、 A_r は共役二重結合系であり、Xはフッ素原子または一般式

(2)

【化7】



で表される基であり、nは整数である。) で表される蛍光性化合物、及び該蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯体、及び該蛍光性化合物または該錯体を有する免疫測定用標識試薬を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】上記一般式 (1) において、Rはタンパク質に結合可能な基であり、具体的には、次に示す基を挙げることができる。

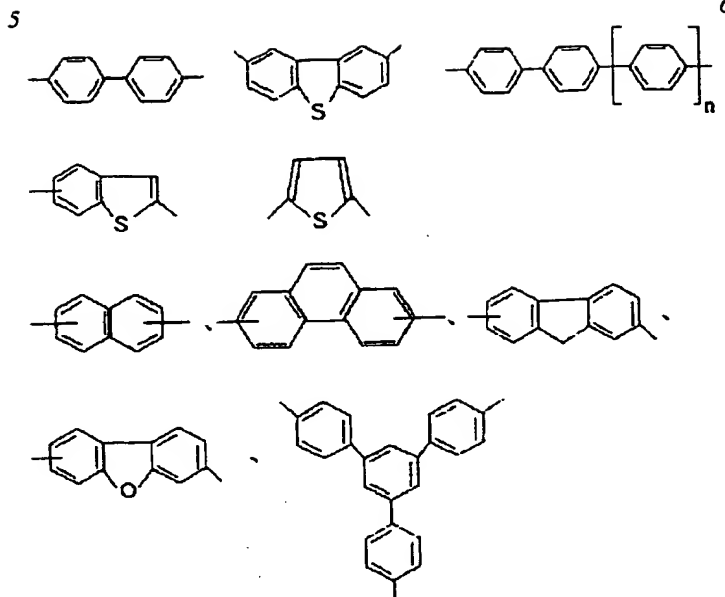
【化8】

アルブミン、ハプテン、ホルモン、ポリペプチド、核酸、ポリヌクレオチド等が挙げられる。

【0010】上記一般式 (1) において、 A_r は共役二重結合系であり、例えば、アリール基や次に示すものが挙げられる。

【化9】

(4)



上記一般式(1)において、 n は整数であり、通常、1～6である。

【0011】本発明で用いられるランタノイド金属イオンとしては、例えば、ユウロピウム(Eu)、サマリウム(Sm)、テルビウム(Tb)、ジスプロシウム(Dy)等のイオンを挙げることができる。

【0012】蛍光性化合物の合成は、二つの工程からなる。以下、第一工程と第二工程に分けて説明する。

第一工程

アセチル化芳香環化合物類とエチルパーフルオロカルボキシレート類またはジエチルパーフルオロジカルボキシレート類とのクライゼン縮合反応によって、 β -ジケトン類化合物を合成する。アセチル化芳香環状化合物類の具体例としては、4'-フェニルアセトフェノン、2-アセチルジベンゾチオフェン(ジベンゾチオフェンと塩化アセチルとの反応によって合成される。)、メチル-4, 4', 4''-テルフェニルケトン(4, 4', 4''-テルフェニルケトンと塩化アセチルとの反応によって合成される。)、2-アセチルチオフェン、2-アセチルベンゾチオフェン(ベンゾチオフェンと塩化アセチルとの反応によって合成される。)、4, 4'-ジアセチル-*o*-テルフェニル(*o*-テルフェニルと塩化アセチルとの反応によって合成される。)等が挙げられる。

【0013】エチルパーフルオロカルボキシレート類の具体例としては、トリフルオロ酢酸エチル、ペンタフルオロプロピオン酸エチルエステル、エチルヘプタフルオロブチレート、エチルパーフルオロペンタノエート等が挙げられる。ジエチルパーフルオロジカルボキシレート類の具体例としては、ジエチルジフルオロマロネート、ジエチルテトラフルオロサクシネート、ジエチルヘキサフルオログルタレート、ジエチルパーフルオロアジペート、ジエチルデカフルオロピメレート、ジエチルドデフ

ルオロスベレート等が挙げられる。第一工程の合成経路図を図1に示す。図中、 NaOCH_3 は触媒であり、乾燥エーテルは溶媒である。得られた生成物は、再結晶によって精製される。再結晶溶媒としてはエタノール、1, 4-ジオキサンまたはそれらの混合溶媒を用いる。

【0014】第二工程

合成した β -ジケトン類化合物とクロロ硫酸とのクロロスルホン化反応によって、 β -ジケトン分子の芳香環にクロロスルホン基(ClSO_2-)を導入する。クロロ硫酸と β -ジケトンとの反応が終了した後、冷水中で未反応のクロロ硫酸を加水分解させると、クロロスルホン化 β -ジケトンは冷水中に溶解せず、沈澱として得られる。第二工程の合成経路図を図2に示す。

【0015】二つの塩化スルフォニル基を有する蛍光性化合物の場合、該化合物をタンパク質の標識反応に直接使用すると、ポリマー標識タンパク質を生成する可能性がある。標識する前にどちらか一つの塩化スルフォニル基の保護を行うと、これを防ぐことができる。保護反応は、 $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ の存在下で $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2$ 等を用い、DMFまたはアセトニトリル中で行う。この保護反応を行うことによって、ポリマーの生成を防ぐことができ、Euとの錯体の蛍光強度を増大することができるという効果が得られる。しかし、この保護反応を行わなくてもポリマーの生成が起こらないことが、同じような構造を有する蛍光性化合物について報告されているので、保護反応を必ずしも行う必要はない。

【0016】以上の工程によって、蛍光性化合物を合成することができる。タンパク質の標識反応は、クロロスルホン基とアミノ基とのアミド形成反応によって行われる。室温で炭酸緩衝溶液($\text{pH}=9.0\sim 9.5$)中で反応が容易に進行する。標識タンパク質の合成経路図を図3に示す。本発明の標識試薬を用いる免疫測定法と

7
 しては、例えば、時間分解蛍光免疫測定法や特異的結合アッセイを挙げることができる。時間分解蛍光免疫測定法とは、長寿命の蛍光標識体（Eu-キレート等）を用い、短時間の蛍光寿命のバックグラウンドの蛍光が消失した後に、標識体の蛍光シグナルのみを時間分解蛍光測定する高感度な蛍光免疫測定法を指す。特異的結合アッセイとは、抗原抗体反応を利用した免疫測定、レセプター・アクセプターの結合反応を利用したアッセイ、核酸*

*のハイブリダイゼーションを利用したアッセイ等を指す。

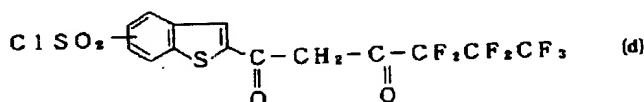
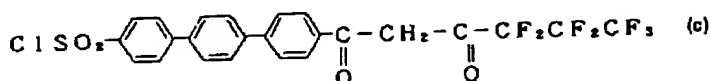
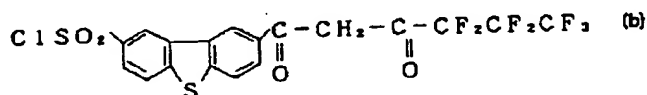
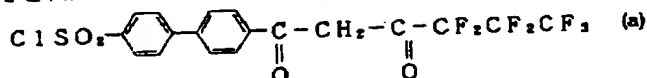
【0017】

【実施例】

蛍光性化合物（a）～（d）の製造

次の化学式（a）～（d）に示す蛍光性化合物の製造方法について説明する。

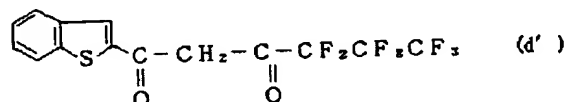
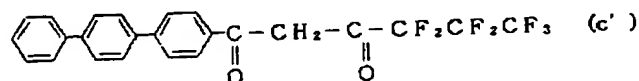
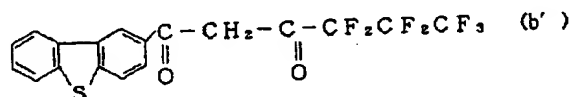
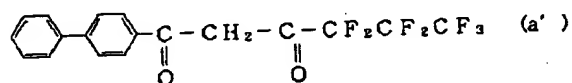
【化10】



【0018】40gの乾燥エーテル中に、2.5gのNaOCH₃、10mmolのArCOCH₃（4'-フェニルアセトフェノン、2-アセチルジベンゾチオフェン、メチル-4,4',4''-テルフェニルケトン、2-アセチルベンゾチオフェンから選択されたもの）及び10mmolのC₃F₇COOC₂H₅を加え、室温において密封し、24時間攪拌した。蒸留（または揮発）によってエーテルを除去し、固体を30分間真空乾燥した。100mlの15%硫酸を加え、室温で30分間十分攪拌し、生成したβ-ジケトンのナトリウム塩を中和した。生成したβ-ジケトンの沈澱を吸引濾別し、水でよく洗浄した。これを24時間真空乾燥した後、エタノールでβ-ジケトン再結晶化させた。すなわち、還流によってβ-ジケトンを溶解させ、熱濾過した後、濾液を-20℃で24時間放置して結晶化させた。生成したβ-ジケトンの結晶を濾別し、室温で48時間以上真空乾燥した。その結果、次に示す中間体（a'）～（d'）が得られた。

【0019】

【化11】



【0020】収率は、（a'）が76%、（b'）が65%、（c'）が82%、（d'）が70%であった。（a'）～（d'）の元素分析の結果を次の表1に示す。

【表1】

	理論値 (%)		測定値 (%)	
	C	H	C	H
a'	55.11	2.83	55.35	2.56
b'	51.19	2.15	51.40	1.95
c'	61.54	3.23	61.60	3.11
d'	49.43	2.07	49.76	1.91

【0021】次に、0℃において、攪拌下の3mlのクロロ硫酸中に2mmolのβ-ジケトン（上記（a'）～（d'）の化合物）を徐々に加えた。0～10℃で4～10時間攪拌した後、注意深く反応溶液を攪拌下の80mlの水-氷中（外部を氷-水で冷却する。）に徐々に滴下した。生成した沈澱を早く遠心分離し、冷たい水（約5℃）で沈澱を洗い、2回遠心分離した。少量の冷たい水で沈澱をガラスフィルターに移し、吸引濾過によって水を除去した。生成したクロロスルフィニル化β-ジケトンを室温で48時間以上、真空乾燥した。収率は、（a）が85%、（b）が89%、（c）が91%、（d）が84%であった。元素分析の結果を表2に示す。

【0022】

【表2】

	理論値 (%)		測定値 (%)	
	C	H	C	H
a	42.49	2.38	42.20	2.47
b	41.51	1.55	41.04	1.48
c	50.85	2.49	50.40	2.31
d	35.72	1.28	35.40	1.06

【0023】蛍光性化合物（b）を用いたタンパク質の標識

上記（b）の蛍光性化合物を用いたウシ血清アルブミンの標識について説明する。まず、50mgのウシ血清アルブミン（以下、「BSA」とも略す。）を8mlの0.1mol/L炭酸緩衝溶液（pH=9.3）中に溶解し、室温下、ウシ血清アルブミンのアミノ基（59個

-NH₂/分子）と等モル数の上記（b）の蛍光性化合物を含有する2mlのDMF溶液を、攪拌下のBSA溶液に徐々に滴下した。室温で1時間攪拌した後、ゲル濾過によって、標識BSAと未反応の蛍光性化合物の加水分解物を分離した。この分離の際、展開溶媒としては、

（ゲルSephadex G-50, 1.0×29.1cm）, pH=8.0の0.05mol/Lの炭酸水素アンモニウム水溶液を用いた。流速は1ml/90秒とし、1mlずつ流出液を収集した。このカラムの条件で10 10mlの溶液の分離を1回行うと分離効果が良くないので、2つのカラムで5mlずつの溶液の分離を行った。標識BSAの画分を集め、4℃において、水に対して一晚透析することによって無機塩を除去した。ゲル濾過前の溶液を用いて、330nmにおける溶液の吸光度を測定した。用いた蛍光性化合物のモル濃度と330nmの吸光度から、330nmにおける蛍光性化合物のモル吸光係数を計算した。結果は、吸光係数が $1.8 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ であり、330nmにおけるウシ血清アルブミンの吸収はなかった。モル吸光係数は標識反応の過程に変化しないとの仮定を用い、標識BSA溶液中のラベルの濃度及びラベルとBSAとの結合比を計算した。以上の方法で得られた標識BSA画分中のBSAと蛍光性化合物の結合比は約20であった。これを「BSA（ラベル）20」と表す。

【0024】蛍光強度の測定方法と結果

蛍光の測定には、Hitachi F-4500蛍光分光光度計（日立製作所製）を用い、150Wのキセノンランプを励起光源とした。測定前にローダミンBを光量子計として用い、励起側分光器（200～600nm）の波長特性等を補正し、拡散素子を用い、蛍光側分光器（200～600nm）の波長特性、検知器の波長特性等を補正した。蛍光寿命の測定には、LPX100Excimer Laserパルス光源（パルス半値幅<10ns, 10Hz, Lambda Physik社製）とHR320分光器（SPEX社製）を組み合わせた装置を用い、遅延時間（delay time）の変化に伴う蛍光強度の変化を測定し、 $\ln I(t) = \ln I(0) - t/\tau$ 式により、蛍光寿命 τ を計算した。時間分解蛍光測定にはCyber Fluor 615時間分解蛍光光度計を用い、337.1nmの窒素レーザーで励起させ、615nmの蛍光強度を測定した。測定条件は、遅延時間（delay time）が200μs、測定時間（counting time）が200～600μsであった。測定用ウェルとしては、白色不透明のポリスチレン製のもの（Dynatech Laboratories社製）を用いた。

【0025】各蛍光性化合物をアセトン、メタノール、エタノール等の有機溶剤に溶解し、EuCl₃溶液を用い、蛍光性化合物-Eu³⁺の標準溶液を調製し、蛍光強度を測定した。結果を表3に示す。

【表3】

蛍光性化合物	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	蛍光強度($10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ m}^{-1}$)
LKBシステム (従来法)	339	610	12.16
a'	360	610	約 120
b'	360	610	約 120
c'	360	610	約 120
d'	360	610	約 120

【0026】ユロピウム (III) 存在下の標識BSA溶液の蛍光特性

β -ジケトン標識BSA溶液に EuCl_3 溶液を加えると、強い蛍光性溶液になる。この溶液を用いて、BSA*

Tris-HCl中: $\lambda_{ex, max} = 253 \text{ nm}$ 、 331 nm
 $\lambda_{em, max} = 612 \text{ nm}$

topo-SDS : $\lambda_{ex, max} = 253 \text{ nm}$ 、 339 nm
 - NaHCO_3 中 $\lambda_{em, max} = 614 \text{ nm}$

BSA (b) $_{21}$ - Eu^{3+} 溶液の蛍光強度に対するpH及び緩衝溶液の影響、蛍光寿命を測定した結果を表4に示す。

* (b) $_{21}$ - Eu^{3+} 溶液の蛍光スペクトル、蛍光強度に対するpH及び緩衝溶液の影響と蛍光寿命を測定した。BSA (b) $_{21}$ - Eu^{3+} 溶液の蛍光スペクトルは次の通りであった。

※【0027】
【表4】

緩 衝 液	0.1mol/L Tris-HCl					0.1mol/L 炭酸塩	0.1mol/L リン酸塩	1.0 $\times 10^{-5}$ mol/L topo-0.05% SDS -0.1mol/L NaHCO_3
pH	7.2	7.8	8.5	9.1	9.9	9.3	9.0	8.4
相対蛍光強度	62	77	90	96	100	49	27	250
蛍 光 寿 命	300 μs							425 μs

* $\lambda_{ex} = 337 \text{ nm}$.

測定用溶液: BSA(b) $_{21}$ - Eu^{3+} , $[\text{BSA(b)}_{21}] = 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $[\text{Eu}^{3+}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

表4から、蛍光強度は溶液のpH及び緩衝溶液の組成に依存することがわかった。Tris-HCl溶液中では、強い蛍光を有する。相対的に炭酸緩衝溶液中では蛍光が弱くなり、リン酸緩衝溶液中では蛍光が著しく弱くなる。さらに、 Eu^{3+} と強い配位能力のあるtopoの溶液を用いると、topoの強力な「synergic 効果」によって蛍光が著しく強くなる。同時に蛍光寿命も少し増大する。なお、溶液中に溶解した酸素が溶液の蛍光に影響しないことを実験で確認した。

【0028】標識BSA溶液の時間分解蛍光測定

得られたBSA (b) $_{21}$ 溶液、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ のtopo-0.05%のSDS-0.1mol/Lの NaHCO_3 溶液、及び $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ の EuCl_3 溶液を用い、BSA (b) $_{21}$ - Eu^{3+} の標準溶液 ($4.24 \times 10^{-14} \text{ mol/L}$) を調整した。各

溶液には、 Eu^{3+} の濃度を $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ に固定し、BSA (b) $_{21}$ の濃度を変化させた。調整した溶液は、室温で2時間放置した後、時間分解蛍光測定を行った。測定時は、同じ濃度の溶液を4つのウェルに分注し ($300 \mu\text{l}$ /ウェル)、測定結果の平均値を測定結果 (I) とした。同様に、溶媒も4つのウェルに分注し、測定結果の平均値をバックグラウンド (I_0) とした。検量線を引く際に、 $(I - I_0)$ 値をフルオレセンス・カウント (fluorescence count) として使用した。結果を図4に示す。図4から求めた蛍光性化合物 (b) の検出限界は、 $8.9 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ であった。

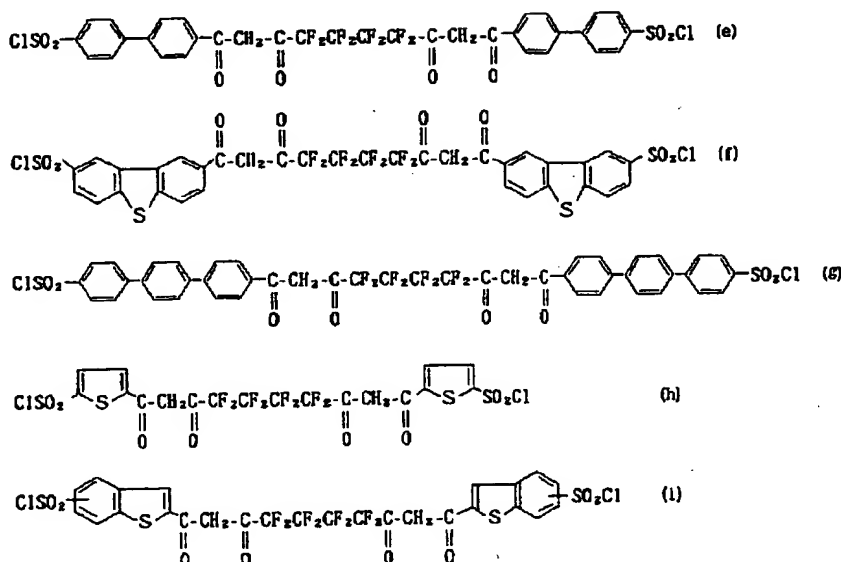
【0029】時間分解蛍光測定装置 (「Cyber Fluor 615」) を用いて、本発明の標識試薬 (標識BSA- Eu^{3+}) と従来法 (LKBシステム、芳香ア

ミン型標識試薬)の検出感度を比較した。表5から、本発明の蛍光性化合物は、LKBシステムの5倍、BCPDA(芳香型標識試薬)の約1000倍感度が良いことがわかる。

【表5】

	蛍光性化合物の検出限界 (mol/L)
LKBシステム	5.0×10^{-11}
BCPDA	1.0×10^{-8}
b	8.9×10^{-12}

*

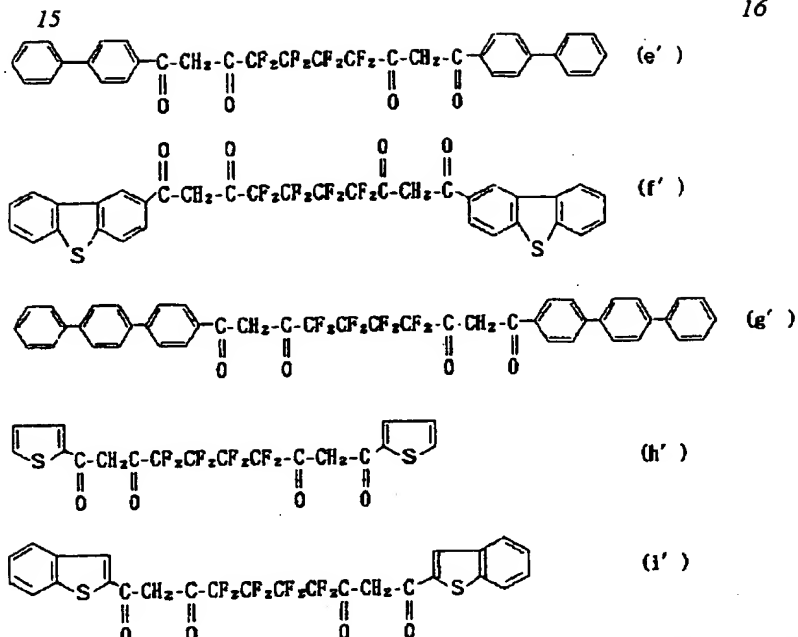


【0031】50gの乾燥エーテル中に、3.0gのNaOCH₃、20mmolのArCOCH₃(4'-フェニルアセトフェノン、2-アセチルジベンゾチオフェン、メチル-4,4',4"-テルフェニルケトン、2-アセチルチオフェン、2-アセチルベンゾチオフェンから選択されたもの)及び10mmolのC₂H₅COCCl₂F₃COOC₂H₅を加え、室温において密封し、24時間攪拌した。蒸留(または揮発)によってエーテルを除去し、固体を30分間真空乾燥した。100mlの15%硫酸を加え、室温で30分間充分攪拌し、生成したβ-ジケトンのナトリウム塩を中和した。生成したβ-ジケトンの沈澱を吸引濾別し、水でよく洗浄し

た。これを24時間真空乾燥した後、5:1の混合比のエタノールと1,4-ジオキサン(4'-フェニルアセトフェノン、メチル-4,4',4"-ターフェニルケトンを用いた場合)または1,4-ジオキサン(2-アセチルジベンゾチオフェンを用いた場合)またはエタノール(2-アセチルチオフェン、2-アセチルベンゾチオフェンを用いた場合)でβ-ジケトンを再結晶化させた。生成したβ-ジケトンの結晶を濾別し、室温で48時間以上真空乾燥した。その結果、次に示す中間体(e')~(i')が得られた。

【0032】

【化13】



【0033】収率は、(e')が65%、(f')が50%、(g')が71%、(h')が79%、(i')が69%であった。(e')~(i')の元素分析の結果を次の表6に示す。

【表6】

	理論値(%)		測定値(%)	
	C	H	C	H
e'	63.16	3.43	63.70	3.15
f'	57.79	2.57	57.62	2.51
g'	69.17	3.78	69.45	3.52
h'	42.69	1.99	42.56	2.04
i'	51.49	2.33	51.78	2.10

【0034】次に、0℃において、攪拌下の5mlのクロロ硫酸中に2mmolのβ-ジケトン(上記(e')~(i')の化合物の中から選択されたもの)を徐々に加えた。0~10℃で4~10時間攪拌した後、注意深く反応溶液を攪拌下の120mlの水-氷中(外部を氷-水で冷却する。)に徐々に滴下した。生成した沈澱を早く遠心分離し、冷たい水(約5℃)で沈澱を洗い、2回遠心分離した。少量の冷たい水で沈澱をガラスフィルターに移し、吸引濾過によって水を除去した。ただし、(h)の沈澱は非常に小さいので、2回の遠心分離後、上澄みを捨てるに止めた。生成したクロロスルフィニル

化β-ジケトン室温で48時間以上、真空乾燥した。収率は、(e)が85%、(f)が86%、(g)が89%、(h)が30%、(i)が80%であった。元素分析の結果は次の表7の通りである。

【0035】

【表7】

	理論値(%)		測定値(%)	
	C	H	C	H
e	46.43	2.75	46.29	2.40
f	42.64	2.31	42.38	1.95
g	53.55	3.13	53.21	2.91
h	28.54	1.86	28.14	1.67
i	37.20	1.92	36.98	1.69

【0036】蛍光性化合物(e)を用いたタンパク質の標識

上記(e)の蛍光性化合物を用いたウシ血清アルブミンの標識について説明する。攪拌下の75.3mg(0.0856mmol)の上記(e)化合物と1.00mlの乾燥DMF溶液に、0.128mol/LのNH₂CH(CH₃)₂-0.150mol/LのN(C₂H₅)₃のDMF溶液を1.00ml滴下した。室温で20~30分間攪拌した後、このDMF溶液を、攪拌下の50mgのBSA-10mlの0.1mol/L炭

酸緩衝溶液 (pH=9.30) の溶液に徐々に滴下し、室温で1時間攪拌した。ゲル濾過によって、標識BSAと未反応の蛍光性化合物とを分離した。この分離の際、展開溶媒としては、(ゲル Sephadex G-50, 1.0×29.1cm), pH=8.0の0.05 mol/Lの炭酸水素アンモニウム水溶液を用いた。流速は1ml/90秒とし、1mlずつ流出液を収集した。このカラムの条件で10mlの溶液の分離を1回行うと分離効果が良くないので、3mlずつの溶液の分離を行った。標識BSAの画分を集め、4℃において、水に対して一晩透析することによって無機塩を除去した。ゲル濾過前の溶液を用いて、330nmにおける溶液の吸光度を測定した。用いたBSAのモル濃度と330nmの吸光度から、330nmにおけるBSAのモル吸光係数を計算した。結果は、吸光係数が $3.65 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ であった。標識BSA画分中のBSAと蛍光性化合物の結合比は約26であった。

【0037】以上の反応において、蛍光性化合物の量を増加させ、 $\text{NH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ のDMF溶液の濃度を増加させることによって、さらに高い結合比をもつBSA (蛍光性化合物) の溶液が得られた。蛍光性化合物の量を263.9mgとし、0.342 mol/Lの $\text{NH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - 0.50 \text{ mol/L}$ の $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ のDMF溶液を用いることによって、最高47の結合比の溶液が得られた。

【0038】蛍光性化合物 (e) を用いたアビジン及びストレプトアビジンの標識

上記 (e) の蛍光性化合物を用いたアビジン (AD) 及 *

*びストレプトアビジン (SA) の標識について説明する。

攪拌下の11.8mg (0.013 mmol) の上記蛍光性化合物 (e) - 250 μLのアセトニトリル溶液の溶液に、250 μLの0.072 mol/Lの $\text{NH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3)_2 - 0.10 \text{ mol/L}$ の $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ のアセトニトリル溶液を滴下した。室温で30分間攪拌した後、乾燥窒素ガスの流れでアセトニトリル溶媒を飛ばさせた。その後、5mgのアビジン (またはストレプトアビジン) - 1.1 mlの炭酸緩衝溶液 (0.1 mol/L, pH=9.1) - 25 μLのDMFの溶液を加え、室温で2時間攪拌した。遠心分離によって不溶物を分離し、2.0 mlの0.05 mol/Lの Tris-HCl 緩衝溶液 (pH=7.7) で沈澱を洗い、遠心分離後、2回の上澄みを合わせて、0.1 mol/Lの $\text{NaHCO}_3 - 0.25 \text{ g}$ の NaN_3 溶液4 Lに対して、4℃で2回 (1回目は16時間、2回目は6時間) 透析した。この方法で得られた標識タンパク質溶液中のタンパク質-蛍光性化合物の結合比は約8であった。

【0039】以上に示した方法は、抗体等のタンパク質の標識にも応用することができる。標識アビジンまたは標識ストレプトアビジンを用いて、ビオチンで標識した抗体、抗原、DNA等とのアビジン-ビオチン反応によって、イムノアッセイに直接応用することができる。

【0040】蛍光強度の測定方法と結果

蛍光強度の測定方法は、上記蛍光性化合物 (b) を用いた場合と同様である。結果を表8に示す。

【表8】

蛍光性化合物	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	蛍光強度 ($10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ m}^{-1}$)
LKBシステム (従来法)	339	610	12.16
e'	360	610	約 150
f'	360	610	約 150
g'	360	610	約 150
h'	360	610	約 150
i'	360	610	約 150

【0041】ユウロピウム (III) 存在下の標識BSA溶液の蛍光特性

β-ジケトン標識BSA溶液に EuCl_3 溶液を加えると、強い蛍光性溶液になる。蛍光性化合物として上記

(e) 化合物を用いて、BSA (e) - Eu^{3+} 溶液の蛍光スペクトル、蛍光強度に対するpH及び緩衝溶液の影響と蛍光寿命を測定した。BSA (e) - Eu^{3+} 溶液の蛍光スペクトルは次の通りであった。

Tris-HCl 中: $\lambda_{\text{ex. max}} = 336 \text{ nm}$ 、

$\lambda_{\text{em. max}} = 611.6 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)

炭酸緩衝溶液中: $\lambda_{\text{ex. max}} = 330 \text{ nm}$ 、

$\lambda_{\text{em. max}} = 611.2 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)

topo-SDS: $\lambda_{\text{ex. max}} = 341 \text{ nm}$

- NaHCO_3 * 中 $\lambda_{\text{em. max}} = 613.6 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)

19

20

(* $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ の $\text{topo}-0.05\%$ の $\text{SDS}-0.1 \text{ mol/L}$ の NaHCO_3 溶液)

結合比 n が変化しても、蛍光スペクトルの形は変化しない。

【0042】 $\text{BSA}(e)_n - \text{Eu}^{3+}$ 溶液の蛍光強度に対する pH 及び緩衝溶液の影響、蛍光寿命を測定した結果を表9に示す。表9において、 $\text{pH} 9.1$ の 0.1 mol/L の

0.1 mol/L の Tris-HCl 溶液の蛍光強度（カウント）を100とし、他の溶液の相対蛍光強度を計算した。結合比 n が変化しても、相対蛍光強度は変化しない。

【表9】

緩 衝 液	0.1mol/L Tris-HCl					0.1mol/L 炭酸塩	0.1mol/L リン酸塩	$1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ $\text{topo}-0.05\% \text{ SDS}$ $0.1 \text{ mol/L NaHCO}_3$
pH	7.2	7.8	8.5	9.1	9.9	9.3	9.0	8.4
相対蛍光強度	70	75	88	100	100	61	3	508
蛍 光 寿 命	260 μs							290 μs

* $\lambda_{\text{ex}} = 337 \text{ nm}$

測定用溶液: $\text{BSA}(e)_{30} - \text{Eu}^{3+}$, $[\text{BSA}(e)_{30}] = 1.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

【0043】次に、蛍光性化合物として上記(f)化合物を用いて、 $\text{BSA}(f)_n - \text{Eu}^{3+}$ 溶液の蛍光スペクトル、蛍光強度に対する pH 及び緩衝溶液の影響と蛍光*

※寿命を測定した。 $\text{BSA}(f)_n - \text{Eu}^{3+}$ 溶液の蛍光スペクトルは次の通りであった。

Tris-HCl 中: $\lambda_{\text{em, max}} = 253 \text{ nm}$, 339 nm
 $\lambda_{\text{em, max}} = 612 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)
 炭酸緩衝溶液中: $\lambda_{\text{em, max}} = 253 \text{ nm}$, 330 nm
 $\lambda_{\text{em, max}} = 611.6 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)
 リン酸緩衝溶液中: $\lambda_{\text{em, max}} = 253 \text{ nm}$, 332 nm
 $\lambda_{\text{em, max}} = 611.6 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)
 topo-SDS : $\lambda_{\text{em, max}} = 253 \text{ nm}$, 341 nm
 $-\text{NaHCO}_3$ 2) 中 $\lambda_{\text{em, max}} = 613.5 \text{ nm}$ (半値幅=約9 nm)

2) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ の $\text{topo}-0.05\%$ の $\text{SDS}-0.1 \text{ mol/L}$ の NaHCO_3 溶液

結合比 n が変化しても、蛍光スペクトルの形は変化しない。

【0044】 $\text{BSA}(f)_n - \text{Eu}^{3+}$ 溶液の蛍光強度に対する pH 及び緩衝溶液の影響、蛍光寿命を測定した結果を表10に示す。表10において、 $\text{pH} 9.1$ の 0.1 mol/L の

1 mol/L の Tris-HCl 溶液の蛍光強度（カウント）を100とし、他の溶液の相対蛍光強度を計算した。結合比 n が変化しても、相対蛍光強度は変化しない。

【表10】

21

22

緩 衝 液	0.1mol/L Tris-HCl					0.1mol/L 炭酸塩	0.1mol/L リン酸塩	1.0×10 ⁻⁵ mol/L topo-0.05% SDS 0.1mol/L NaHCO ₃
p H	7.2	7.8	8.5	9.1	9.9	9.3	9.0	8.4
相対蛍光強度	54	72	92	100	89	76	37	621
蛍 光 寿 命	227 μs							240 μs

* λ_{ex} = 337 nm測定用溶液: BSA(f)₄₀-Eu³⁺, [BSA(f)₄₀] = 2.2×10⁻⁵ mol/L, [Eu³⁺] = 1.0×10⁻⁶ mol/L

【0045】表9と表10の結果から、蛍光強度は溶液のpH及び緩衝溶液の組成に依存することがわかった。Tris-HCl溶液中では、強い蛍光を有する。相対的に炭酸緩衝溶液中では蛍光が弱くなり、リン酸緩衝溶液中では蛍光が著しく弱くなる。さらに、Eu³⁺と強い配位能力のあるtopoの溶液を用いると、topoの強力な「synergic効果」によって蛍光が著しく強くなる。同時に蛍光寿命も少し増大する。なお、溶液中に溶解した酸素が溶液の蛍光に影響しないことを実験で確認した。

【0046】標識BSA溶液の時間分解蛍光測定

得られたBSA (e)₄₁溶液またはBSA (f)₄₀溶液、1.0×10⁻⁵ mol/Lのtopo-0.05%のSDS-0.1 mol/LのNaHCO₃溶液、及び1.0×10⁻⁵ mol/LのEuCl₃溶液を用い、BSA (蛍光性化合物)₄₁-Eu³⁺の標準溶液 (BSA (e)₄₁溶液は1.6×10⁻¹⁴ mol/L、BSA (f)₄₀溶液は9.3×10⁻¹⁴ mol/L)を調整した。各溶液には、Eu³⁺の濃度を1.0×10⁻⁶ mol/Lに固定し、BSA (蛍光性化合物)₄₁の濃度を変化させた。調整した溶液は、室温で2時間放置した後、時間分解蛍光測定を行った。測定時は、同じ濃度の溶液を4つのウェルに分注し(300 μl/ウェル)、測定結果の平均値を測定結果(I)とした。同様に、溶媒も4つのウェルに分注し、測定結果の平均値をバックグラウンド(I₀)とした。検量線を引く際に、(I-I₀)値をフルオレセンス・カウント(fluorescence count)として使用した。結果を図5に示す。図5から求めた蛍光性化合物の検出限界は、化合物(e)で7.5×10⁻¹³ mol/L、化合物(f)で3.7×10⁻¹²であった。

【0047】時間分解蛍光測定装置(「Cyber Fluor 615」)を用いて、本発明の標識試薬(標*

元素分析結果: 理論値: C%=84.05、H%=5.77

測定値: C%=84.06、H%=5.87

¹H-NMRで生成物が目標化合物であることを確認した。

* 標識BSA-Eu³⁺)と従来法(LKBシステム、芳香アミン型標識試薬)の検出感度を比較した。表11から、本発明のラベル化剤はLKBシステムの数10倍、蛍光性化合物としてBCPDAを用いた芳香型標識試薬の約2000倍以上感度が良いことがわかる。

【表11】

	蛍光性化合物の検出限界 (mol/L)
LKBシステム	5.0×10 ⁻¹¹
BCPDA	1.0×10 ⁻⁹
e	7.5×10 ⁻¹³
f	3.7×10 ⁻¹²

【0048】4, 4'-ジアセチル-ο-テルフェニルの合成

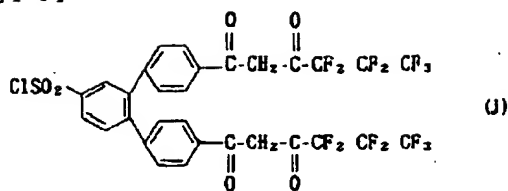
アセチル化芳香環状化合物類として、4, 4'-ジアセチル-ο-テルフェニルを用いた実施例について、以下に述べる。まず、4, 4'-ジアセチル-ο-テルフェニルの合成方法を説明する。0℃において、攪拌下の200 mlのCH₂Cl₂と、210 mmolのAlCl₃と、205 mmolのCH₃COClの溶液に、100 mlのCH₂Cl₂と100 mmolのο-テルフェニルの溶液を徐々に滴下した。0℃で30分間攪拌した後、室温で24時間攪拌した。さらに2時間還流した後、反応溶液を氷+塩酸(濃)中に注ぎ、充分攪拌した後、減圧蒸留によってCH₂Cl₂を除去した。沈澱を濾別し、水でよく洗浄した。約250 mlの2-ブタノンで生成物を再結晶し、生成した針状結晶を濾別し、真空乾燥した。収量は22.1 gであり、収率は70.3%であった。元素分析の結果は次の通りであった。

【0049】蛍光性化合物(j)の中間体(j')の合成

50 成

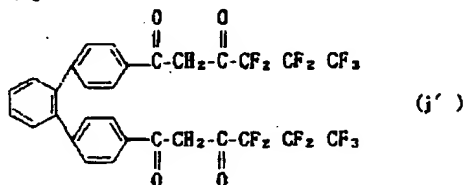
23

【化14】



で表される蛍光性化合物 (j) の中間体 (j')

【化15】



の合成方法を以下に述べる。

元素分析結果： 理論値：C%=51.00、H%=2.28

測定値：C%=51.22、H%=2.61

¹H-NMRで生成物は目標化合物であることを確認した。

【0051】 蛍光性化合物 (j) の合成

室温において、攪拌下の3.5mlのクロロ硫酸中に2mmolのβ-ジケトン (j') を徐々に加えた。室温で7時間攪拌した後、注意深く反応溶液を攪拌下の150mlの水-氷中（外部は氷-水で冷却する。）に徐々※

元素分析結果： 理論値：C%=44.76、H%=1.88

測定値：C%=44.50、H%=1.92

¹H-NMRで生成物は目標化合物であることを確認した。

【0052】 蛍光性化合物 (j) を用いたタンパク質の標識

蛍光性化合物 (j) を用いたウシ血清アルブミン (BSA) の標識について、以下に述べる。50mgのBSAを10.00mlの0.1mol/Lの炭酸緩衝溶液 (pH=9.3) に溶かし、室温下でBSAのアミノ基 (59個-NH₂/分子) と等モル数の蛍光性化合物 (j) を含有する2mlのDMF溶液を攪拌下のBSA溶液に徐々に滴下した。室温で1時間攪拌した後、ゲル濾過によって標識BSAと未反応の蛍光性化合物の加水分解物を分離した。この分離の際、展開溶媒としては、(ゲル Sephadex G-50, 1.0×29.1cm), pH=8.0の0.05mol/Lの炭酸水素アンモニウム水溶液を用いた。流速は1ml/90秒とし、1mlずつ流出液を収集した。このカラムの条件で10mlの溶液の分離を1回行くと分離効果が良くないので、2つのカラムで5mlずつの溶液の分離を行った。標識BSAの画分を集め、4℃において、水に対して一晚透析することによって無機塩を除去した。ゲル濾過前の溶液を用いて、330nmにおける溶液の吸光度を測定した。用いた蛍光性化合物のモル濃度と330nm

24

* 【0050】 30gの乾燥エーテル (Et₂O) 中に3.0gのNaOCH₃、10mmolの4,4'-ジアセチル-*o*-テルフェニル及び20mmolのC₃F₇COOC₂H₅を加え、室温において密封し、24時間攪拌した。蒸留によって乾燥エーテルを除去し、30分間真空乾燥した。100mlの15%硫酸で生成物を中和し、沈澱を濾別し、水でよく洗浄した。沈澱を200mlエタノールに加熱しながら溶解し、濾過によって不溶物を除去した。減圧で溶液を約20mlまで濃縮し、この溶液を攪拌下の200mlの石油エーテル中に徐々に滴下した。充分攪拌した後、析出した少量の沈澱を濾過によって除去し、濾液を減圧濃縮して全ての有機溶媒を除去した。得られた油状物を真空乾燥した後、黄色の粉末が得られた。さらに石油エーテルで黄色粉末を充分洗浄した後、24時間真空乾燥した。収量は4.60gであり、収率は65.0%であった。

※に滴下した。生成した沈澱を早く遠心分離し、冷たい水 (約5℃) で沈澱を洗浄し、2回の遠心分離を行った。少量の冷たい水で沈澱をガラスフィルターに移し、吸引濾過によって水を除去した。室温で48時間以上、生成したクロロスルホン化β-ジケトンを真空乾燥した。収率は77%であった。

mの吸光度から、330nmにおける蛍光性化合物のモル吸光係数を計算した。結果は、吸光係数が3.41mol⁻¹・cm⁻¹・Lであり、330nmにおけるウシ血清アルブミンの吸収はなかった。モル吸光係数は標識反応の過程に変化しないとの仮定を用い、標識BSA溶液中のラベルの濃度及びラベルとBSAとの結合比を計算した。以上の方法で得られた標識BSA画分中のBSAと蛍光性化合物の結合比は約35であった。

【0053】 蛍光性化合物 (j) を用いたストレプトアビジン及びアビジンの標識

上記蛍光性化合物 (j) を用いたストレプトアビジン (SA) 及びアビジン (AD) の標識について説明する。1. 5mgの上記蛍光性化合物 (j) に、5mgのストレプトアビジン (またはアビジン) - 1.1mlの炭酸緩衝溶液 (0.1mol/L, pH=9.1) - 25μLのDMFの溶液を加え、室温で2時間攪拌した。遠心分離により不溶物を分離し、2.0mlの0.05mol/LのTris-HCl緩衝溶液 (pH=7.7) で沈澱を洗い、遠心分離後、2回の上澄みを合わせて、0.1mol/LのNaHCO₃ - 0.25gのNaN₃の溶液4Lに対して、4℃で2回 (1回目は16時間、2回目は6時間) 透析した。この方法で得られた標識タンパク質溶液中のタンパク質-蛍光性化合物の結

合比は約10であった。

【0054】蛍光性化合物(j)を用いたヒツジ抗マウスIgG(H+L)抗体の標識

2mg/mlのヒツジ抗マウスIgG(H+L)抗体2mlを4℃で、3Lの生理食塩水に対して、24時間の透析を2回行った後、0.5mol/LのNa₂CO₃溶液で抗体溶液のpHを9.2に調製した。抗体溶液に2.0mgの上記蛍光性化合物(j)を加え、攪拌下に125μLのDMFを加えた。室温で1時間攪拌した後、更に50μLのDMFを加え、再び室温で1時間攪拌した。遠心分離によって不溶物を除去し、上澄みを*

*0.1MのNaHCO₃-0.25gのNaN₃溶液4Lに対して、4℃で24時間の透析を2回行った。この方法で得られた標識タンパク質溶液中のタンパク質-蛍光性化合物の結合比は約11であった。以上の方法で得られた標識タンパク質が生理活性を保つことを実際のイムノアッセイへの応用によって確認した。

【0055】蛍光強度の測定の実験方法と結果

蛍光強度の測定方法は、上記蛍光性化合物(b)を用いた場合と同様である。結果を表12に示す。

【表12】

蛍光性化合物	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	蛍光強度($10^3 cm^{-1} m^{-1}$)
LKBシステム(従来法)	339	610	12.16
j'	340	610	約150

【0056】ユウロピウム(III)存在下の標識BSA溶液の蛍光特性 20※BSA(j)_{ss}-Eu³⁺溶液の蛍光スペクトルは次の通りであった。

Tris-HCl中: $\lambda_{ex,max}=326nm$
 $\lambda_{em,max}=611.6nm$ (半値幅=約9nm)
 炭酸緩衝溶液中: $\lambda_{ex,max}=324nm$
 $\lambda_{em,max}=611.6nm$ (半値幅=約9nm)
 リン酸緩衝溶液中: $\lambda_{ex,max}=324nm$
 $\lambda_{em,max}=611.6nm$ (半値幅=約9nm)
 topo-SDS: $\lambda_{ex,max}=334nm$
 -NaHCO₃*溶液中: $\lambda_{em,max}=613.4nm$ (半値幅=約9nm)

(*1.0×10⁻⁵mol/Lのtopo-0.05%のSDS-0.1mol/LのNaHCO₃溶液)

【0057】BSA(j)_{ss}-Eu³⁺溶液の蛍光強度に対するpH及び緩衝溶液の影響、蛍光寿命を測定した結果★

【表13】

緩衝液	0.1mol/L Tris-HCl					0.1mol/L 炭酸塩	0.1mol/L リン酸塩	1.0×10 ⁻⁵ mol/L topo-0.05% SDS-0.1mol/L NaHCO ₃
pH	7.2	7.8	8.5	9.1	9.9	9.3	9.0	8.4
相対蛍光強度	75	89	97	100	100	44	16	321
蛍光寿命	261μs							395μs

* $\lambda_{ex}=337nm$

測定用溶液: BSA(j)_{ss}-Eu³⁺, [BSA(j)_{ss}]=1.8×10⁻⁶mol/L, [Eu³⁺]=1.0×10⁻⁶mol/L

【0058】標識BSA溶液の時間分解蛍光測定

得られたBSA(j)_{ss}溶液、1.0×10⁻⁵mol/Lのtopo-0.05%のSDS-0.1mol/LのNaHCO₃溶液、及び1.0×10⁻⁵mol/Lの

EuCl₃溶液を用い、BSA(蛍光性化合物)_{ss}-Eu³⁺の標準溶液(2.8×10⁻¹⁴mol/L)を調整した。各溶液には、Eu³⁺の濃度を1.0×10⁻⁶mol/Lに固定し、BSA(蛍光性化合物)_{ss}の濃度を変

化させた。調整した溶液は、室温で2時間放置した後、時間分解蛍光測定を行った。測定時は、同じ濃度の溶液を4つのウェルに分注し(300 μ l/ウェル)、測定結果の平均値を測定結果(I)とした。同様に、溶媒も4つのウェルに分注し、測定結果の平均値をバックグラウンド(I₀)とした。検量線を引く際に、(I-I₀)値をフルオレセンス・カウント(fluorescence count)として使用した。結果を図6に示す。図6から求めた蛍光性化合物(j)の検出限界は、1.3 $\times 10^{-12}$ であった。

【0059】時間分解蛍光測定装置(「Cyber Fluor 615」)を用いて、本発明の標識試薬(標識BSA-Eu³⁺)と従来法(LKBシステム、芳香アミン型標識試薬)の検出感度を比較した。表13から、本発明の標識試薬はLKBシステムの数10倍、蛍光性化合物としてBCPDAを用いた芳香型標識試薬の数千倍感度が良いことがわかる。

【表14】

	蛍光性化合物の検出限界 (mol/L)
LKBシステム	5.0 $\times 10^{-11}$
BCPDA	1.0 $\times 10^{-8}$
j	1.3 $\times 10^{-12}$

【0060】

【発明の効果】本発明の標識試薬は、測定の対象となる抗原、抗体等のタンパク質と直接結合することが可能であり、標識試薬単体でもタンパク質と結合した状態でもどちらでも蛍光発光が可能である。また、本発明の標識試薬は、 β -ジケトン进行をベースに電子供与基(芳香環置

換基)、電子吸引基(フッ素置換アルキル基)を結合した構造をもつため、強い蛍光発光と長い蛍光寿命を有する。蛍光発光の強さは、LKBシステムにおける標識試薬の約10倍以上であり、芳香アミン型標識試薬の約1000倍以上である。また、本発明の標識試薬は、合成が容易であり、収率も高い。特に、従来のLKBシステムに必要な増強試薬の分注や第三インキュベーション工程が不要である。従来の芳香アミン型標識試薬を用いた測定に必要なウェルの乾燥工程も不要である。

- 10 【0061】また、LKBシステムのように水溶液中にEu(III)を遊離させなくても蛍光発光が可能であるため、環境からの汚染を受けない。また、免疫複体の固相測定、液相測定のいずれも可能である。さらに、本発明の標識試薬は、安定な物質であり、長期保存が可能で、従来の芳香アミン型標識試薬の合成と比べて安価に合成することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】蛍光性化合物の合成の第一工程を表す合成経路図である。

- 20 【図2】蛍光性化合物の合成の第二工程を表す合成経路図である。

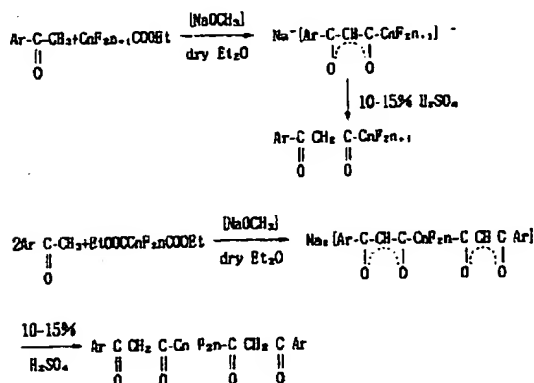
【図3】標識タンパク質の合成経路図である。

【図4】横軸にウシ血清アルブミン(b)₂₁溶液の濃度(M)の対数を、縦軸にフルオレセンス・カウントの対数を表す図である。

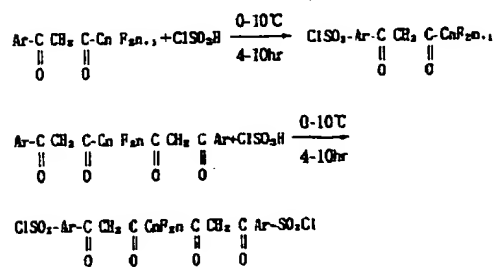
【図5】横軸にウシ血清アルブミン(e)₄₇溶液およびウシ血清アルブミン(f)₄₀溶液の濃度(M)の対数を、縦軸にフルオレセンス・カウントの対数を表す図である。

- 30 【図6】横軸にウシ血清アルブミン(j)₃₅溶液の濃度(M)の対数を、縦軸にフルオレセンス・カウントの対数を表す図である。

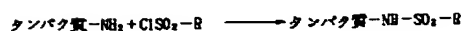
【図1】



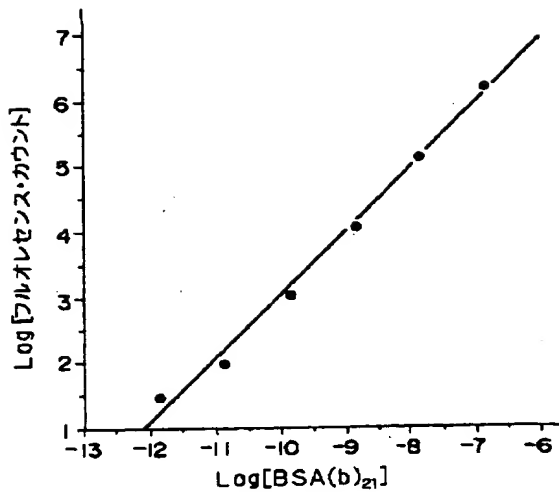
【図2】



【図3】



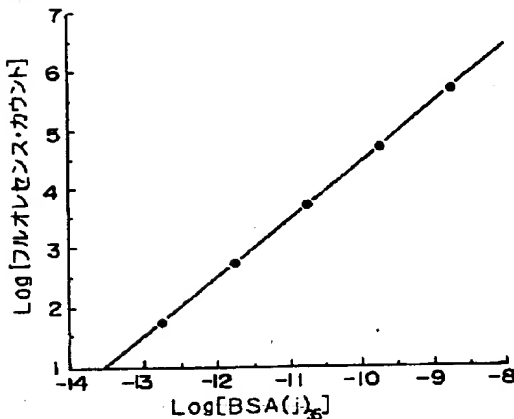
【図4】



$$y = 12.733 + 0.97x$$

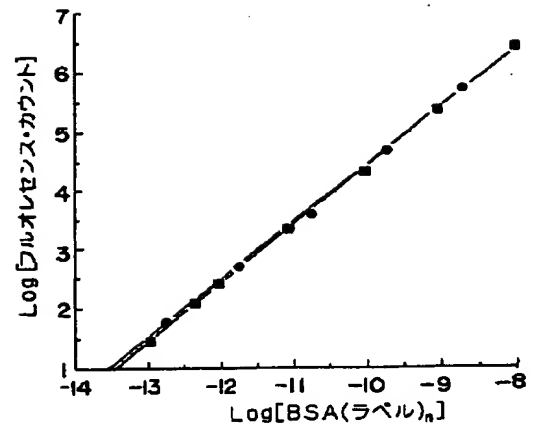
$$R = 0.991$$

【図6】



$$y = 14.228 + 0.98x, R = 1.0$$

【図5】



● BSA(e)₄₇

■ BSA(f)₄₀

$$(e) y = 14.234 + 0.98x \quad R = 1.0$$

$$(f) y = 14.582 + 1.01x \quad R = 1.0$$

【手続補正書】

【提出日】平成8年4月1日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

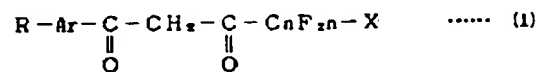
【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を解決するために、本発明は、一般式(1)

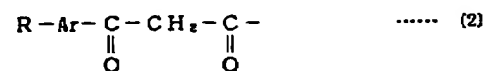
【化6】



(式中、Rはタンパク質に結合可能な基であり、Arは共役二重結合系であり、Xはフッ素原子または一般式

(2)

【化7】



で表される基であり、nは整数である。)で表される基

光性化合物、及び該蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯体、及び該蛍光性化合物または該錯体を有する免疫測定用標識試薬を提供する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】蛍光性化合物の合成は、二つの工程からなる。以下、第一工程と第二工程に分けて説明する。

第一工程

アセチル化芳香環化合物類とエチルパーフルオロカルボキシレート類またはジエチルパーフルオロジカルボキシレート類とのクライゼン縮合反応によって、 β -ジケトン類化合物を合成する。アセチル化芳香環状化合物類の具体例としては、4'-フェニルアセトフェノン、2-アセチルジベンゾチオフェン（ジベンゾチオフェンと塩*

*化アセチルとの反応によって合成される。）、メチル-4, 4', 4''-テルフェニルケトン（4, 4', 4'-テルフェニルと塩化アセチルとの反応によって合成される。）、2-アセチルチオフェン、2-アセチルベンゾチオフェン（ベンゾチオフェンと塩化アセチルとの反応によって合成される。）、4, 4'-ジアセチル-*o*-テルフェニル（*o*-テルフェニルと塩化アセチルとの反応によって合成される。）等が挙げられる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】

【表4】

緩 衝 液	0.1mol/L Tris-HCl					0.1mol/L 炭酸塩	0.1mol/L リン酸塩	1.0×10 ⁻³ mol/L topo-0.05% SDS 0.1mol/L NaHCO ₃
pH	7.2	7.8	8.5	9.1	9.9	9.3	9.0	8.4
相対蛍光強度	62	77	90	96	100	49	27	250
蛍 光 寿 命	300 μ s							425 μ s

* $\lambda_{ex} = 337 \text{ nm}$.

測定用溶液: BSA(b)₂₁-Eu³⁺, [BSA(b)₂₁]=1.5×10⁻⁷mol/L, [Eu³⁺]=5.0×10⁻⁶mol/L

表4から、蛍光強度は溶液のpH及び緩衝溶液の組成に依存することがわかった。Tris-HCl溶液中では、強い蛍光を有する。相対的に炭酸緩衝溶液中では蛍光が弱くなり、リン酸緩衝溶液中では蛍光が著しく弱くなる。さらに、Eu³⁺と強い配位能力のあるtopoの溶液を用いると、topoの強力な「synergic効果」によって蛍光が著しく強くなる。同時に蛍光寿命も少し増大する。なお、溶液中に溶解した酸素が溶液の蛍光に影響しないことを実験で確認した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正内容】

【0052】蛍光性化合物(j)を用いたタンパク質の標識

蛍光性化合物(j)を用いたウシ血清アルブミン(BSA)の標識について、以下に述べる。50mgのBSAを10.00mlの0.1mol/Lの炭酸緩衝溶液(pH=9.3)に溶かし、室温下でBSAのアミノ基(59個-NH₂/分子)と等モル数の蛍光性化合物

(j)を含有する2mlのDMF溶液を攪拌下のBSA溶液に徐々に滴下した。室温で1時間攪拌した後、ゲル濾過によって標識BSAと未反応の蛍光性化合物の加水分解物を分離した。この分離の際、展開溶媒としては、(ゲル Sephadex G-50, 1.0×29.1cm), pH=8.0の0.05mol/Lの炭酸水素アンモニウム水溶液を用いた。流速は1ml/90秒とし、1mlずつ流出液を収集した。このカラムの条件で10mlの溶液の分離を1回行くと分離効果が良くないので、2つのカラムで5mlずつの溶液の分離を行った。標識BSAの画分を集め、4℃において、水に対して一晚透析することによって無機塩を除去した。ゲル濾過前の溶液を用いて、330nmにおける溶液の吸光度を測定した。用いた蛍光性化合物のモル濃度と330nmの吸光度から、330nmにおける蛍光性化合物のモル吸光係数を計算した。結果は、吸光係数が3.41×10⁴mol⁻¹・cm⁻¹・Lであり、330nmにおけるウシ血清アルブミンの吸収はなかった。モル吸光係数は標識反応の過程に変化しないとの仮定を用い、標識BSA溶液中のラベルの濃度及びラベルとBSAとの結合比を計算した。以上の方法で得られた標識BSA画分

中のBSAと蛍光性化合物の結合比は約35であった。

【手続補正書】

【提出日】平成8年7月30日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 免疫測定用標識試薬及びそれに用いる蛍光性化合物及び錯体、及びそれらを用いる生物物質の免疫測定法

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

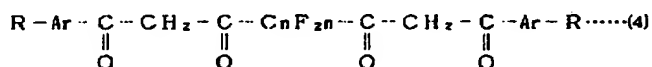
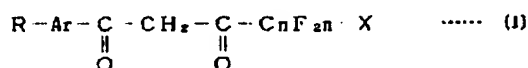
【補正方法】追加

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

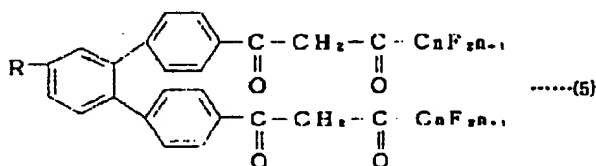
【化1】



で表される請求項1に記載の蛍光性化合物。

【請求項4】 上記一般式(1)が一般式(5)

【化5】



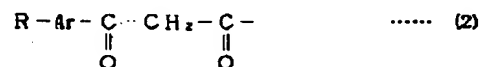
で表される請求項1に記載の蛍光性化合物。

【請求項5】 請求項1～請求項4のいずれかに記載の蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯体。

【請求項6】 請求項1～請求項4のいずれかに記載の蛍光性化合物または請求項5に記載の錯体部分を有する免疫測定用標識試薬。

(式中、Rはタンパク質に結合可能な基であり、Arは共役二重結合系であり、Xはフッ素原子または一般式(2)

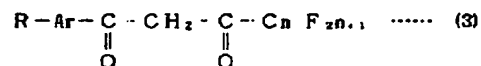
【化2】



で表される基であり、nは整数である。)で表される蛍光性化合物。

【請求項2】 上記一般式(1)が一般式(3)

【化3】



で表される請求項1に記載の蛍光性化合物。

【請求項3】 上記一般式(1)が一般式(4)

【化4】

【請求項7】 請求項1～4のいずれかに記載の蛍光性化合物、または請求項5に記載の錯体、または請求項6に記載の標識試薬を、生物物質に標識として結合した状態で、固相または液相で蛍光測定することを特徴とする生物物質の免疫測定法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】上記一般式(1)中のRと結合するタンパク質等の生物物質としては、具体的には抗体類、ビオチン標識抗体類、抗原類、アビジン、ストレプトアビジン、ウシ血清アルブミン、ハプテン、ホルモン、ポリペプチド、核酸、ポリヌクレオチド等が挙げられる。

【手続補正書】

【提出日】平成8年9月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

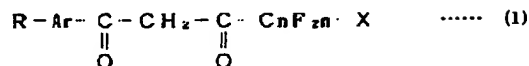
【補正方法】追加

【補正内容】

【特許請求の範囲】

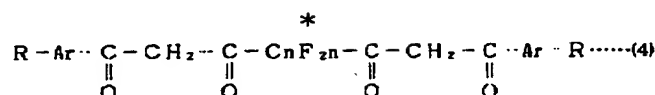
【請求項1】 一般式(1)

【化1】



(式中、Rはタンパク質に結合可能な基であり、Arは共役二重結合系であり、Xはフッ素原子または一般式(2)

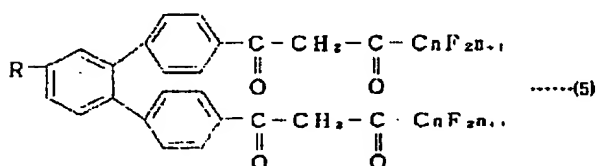
【化2】



で表される請求項1に記載の蛍光性化合物。

【請求項4】 上記一般式(1)が一般式(5)

【化5】

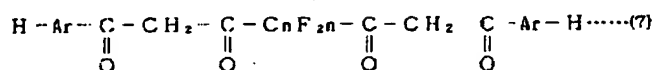


で表される請求項1に記載の蛍光性化合物。

【請求項5】 請求項1～請求項4のいずれかに記載の蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯体。

【請求項6】 請求項1～請求項4のいずれかに記載の蛍光性化合物または請求項5に記載の錯体部分を有する免疫測定用標識試薬。

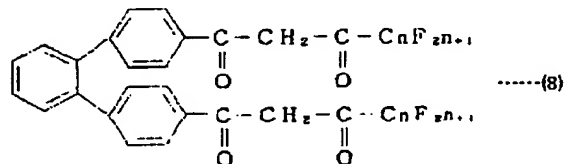
※



(式中、Arは共役二重結合系であり、nは整数である。)で表される蛍光性化合物。

【請求項10】 一般式(8)

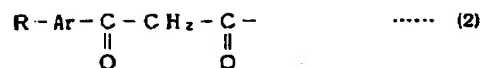
【化8】



(式中、Arは共役二重結合系であり、nは整数である。)で表される蛍光性化合物。

【請求項11】 請求項8～請求項10のいずれかに記載の蛍光性化合物とランタノイド金属イオンからなる錯

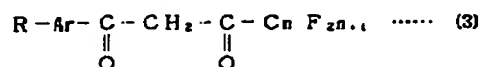
*



で表される基であり、nは整数である。)で表される蛍光性化合物。

【請求項2】 上記一般式(1)が一般式(3)

【化3】



で表される請求項1に記載の蛍光性化合物。

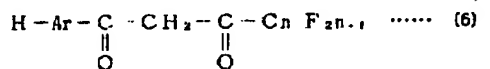
【請求項3】 上記一般式(1)が一般式(4)

【化4】

※【請求項7】 請求項1～4のいずれかに記載の蛍光性化合物、または請求項5に記載の錯体、または請求項6に記載の標識試薬を、生物物質に標識として結合した状態で、固相または液相で蛍光測定することを特徴とする生物物質の免疫測定法。

【請求項8】 一般式(6)

【化6】



(式中、Arは共役二重結合系であり、nは整数である。)で表される蛍光性化合物。

【請求項9】 一般式(7)

【化7】

体。